

**PRODUCTION OF LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN**

**Patent number:** JP2200196  
**Publication date:** 1990-08-08  
**Inventor:** SEKIGUCHI TADAO; KAMEYAMA HIROSHI  
**Applicant:** NIPPON KAYAKU KK  
**Classification:**  
**- international:** C12P19/14  
**- european:**  
**Application number:** JP19890019454 19890131  
**Priority number(s):** JP19890019454 19890131

**Report a data error here**

**Abstract of JP2200196**

**PURPOSE:** To efficiently obtain low molecular weight chitosan in safety and low cost by treating chitosan with at least one of neutral protease and lipase having decomposing ability of chitosan.  
**CONSTITUTION:** Natural chitin derived from lobster or crab, etc., is deacetylated with NaOH, etc., to obtain chitosan having about  $10^6$  molecular weight. Next, said chitosan is treated with HCl, etc., to obtain chitosan solution having pH3-6 and 1-20wt.% chitosan concentration. Then, at least one of neutral protease such as protin P or lipase such as lipase P 'Amano' is added to said solution in an amount of 0.001-10w/w% to chitosan and reacted at 40-50 deg.C for 1-100 hour to obtain reacted substance. Thus, the reacted substance is filtered and pH is adjusted to about 8, then generated precipitation is removed, thus purified with ion exchange resin, etc., to produce low molecular weight chitosan having  $\leq 10^5$  molecular weight.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-200196

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 P 19/14識別記号 庁内整理番号  
Z 8214-4B

④ 公開 平成2年(1990)8月8日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑥ 発明の名称 低分子量キトサンの製造方法

⑦ 特 願 平1-19454

⑧ 出 願 平1(1989)1月31日

⑨ 発 明 者 関 口 忠 雄 埼玉県浦和市辻5-9-26-302  
⑩ 発 明 者 亀 山 博 東京都北区志茂3-17-1-102  
⑪ 出 願 人 日本化薬株式会社 東京都千代田区富士見1丁目11番2号  
⑫ 代 理 人 弁理士 竹田 和彦

明 細 書

## 1. 発明の名称

低分子量キトサンの製造方法

## 2. 特許請求の範囲

キトサンをキトサン分解能を有する中性プロテアーゼ又はリパーゼの1種以上で処理することによって低分子化することを特徴とする、低分子量キトサンの製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、自然界のキチンを脱アセチル化して得られる高分子量のキトサンから、任意の分子量を有する低分子量キトサンを、簡単な操作で安全に製造する方法に関する。

近年、化粧品、医薬品、抗菌剤など、各種の分野で低分子量のキトサンの需要が高まっている。

(従来技術)

従来、低分子量キトサンを製造する方法としては、微生物由来のキトサナーゼを用いる方法、

高濃度の塩酸水溶液中で加熱処理する方法、塩素ガスを用いる方法、過酸化水素を用いる方法などが知られている。

(発明が解決しようとする課題)

これらの方法はキトサナーゼの安全性の未確認、塩酸法の後処理の煩雑さ、塩素ガスの有毒性、残留過酸化水素の問題など、安全性及び経済性に懸点があった。本発明者らは種々検討の結果、安全にしかも安価に、任意の分子量を有する低分子量キトサンを得る方法を見出し、本発明を完成するに至った。

(課題を解決するための手段)

本発明はキトサンをキトサン分解能を有する中性プロテアーゼ及びリパーゼの1種以上で処理することによって低分子化することを特徴とする低分子量キトサンの製造方法に関する。

中性プロテアーゼは食品加工、醸造・発酵、医薬品、飼料等で使用されている安全性の十分確認されている市販品が利用できる。キトサン分解能を有する中性プロテアーゼの例として、プロチン

P (大和化成株式会社製造) パンチダーゼ NP-2 (株式会社ヤクルト本社製造)、プロテアーゼ A「アマノ」(天野製菓株式会社製造)等が上げられる。

リパーゼは油脂の分解・改質、乳製品の改質、醸造・醗酵、医薬品等で使用されている安全性の十分確認されている市販品が利用できる。キトサン分解能を有するリパーゼの例として、リパーゼ P「アマノ」リパーゼ A「アマノ」いずれも(天野製菓株式会社製造)等が上げられる。

本発明で使用するキトサンは、エビ、カニ等から得られる天然のキチンを、例えば苛性ソーダ等で脱アセチル化したものが好ましい。通常分子量 100 万程度以上のものを使用するが、低分子化したいキトサンであればこれ以下の分子量のものでも使用しうる。

キトサンは塩酸又は硝酸等の無機酸及びギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸等の有機酸を用いて水溶液とすることができる。

キトサン溶液に対して中性プロテアーゼ又はリ

パーゼの 1 種以上を作用せしめることにより低分子量キトサンが得られる。

低分子化反応の条件は本発明では特に限定されないが、キトサン溶液の濃度は 1~20%、好ましくは 3~10% である。キトサン溶液の pH は 3~6 が好ましい。中性プロテアーゼ及びリパーゼの使用量は任意の分子量の低分子量キトサンを得るため、特に限定されないが、通常キトサンに対し 0.001~10w/w % 程度使用される。又、反応温度は常温~約 55℃、好ましくは 40~50℃、反応時間は 1~100 時間程度がよい。

分解反応後の低分子量キトサン溶液は、先ず不純物をろ過し、次いでアルカリ金属の水酸化物溶液で pH を約 8 に調整するか、又はエタノール、アセトン等の溶媒を用いて沈殿を生成させ、沈殿物をろ過することにより低分子量キトサンを得ることができる。あるいは分解反応後の低分子量キトサン溶液を濾過し、pH を約 8 に調整した後、生じた沈殿を除去し、次いで生成した塩をイオン交換樹脂、電気透析、透析膜あるいは他の膜を使

う方法、等により脱塩した後、濃縮乾固、凍結乾燥又はスプレードライヤー等で乾燥することにより水溶性の低分子量キトサンを得ることができる。低分子量キトサンの分子量は目的とする性質により種々異なるが、通常 10 万以下、水溶性を付与する場合は数百~数千程度である。しかし目的によっては原料キトサンの分子量以下であれば 10 万以上の場合もある。

以下に実施例で詳細に説明する。

#### 〔実施例 1〕

キトサン 10g を 500ml の水に分散し濃塩酸 4.2g を加え、攪拌溶解した後、市販の中性プロテアーゼのパンチダーゼ PN-2 (株式会社ヤクルト本社製造) 0.5g を 10ml の水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を 45℃ に保持し、12 時間攪拌を続けた。この時の反応液の pH は 5.0 であった。

キトサンの分子量はプルランを標準物質として東ソー株式会社製の TSK gel GMPHXL カラムを用いて GPC 法により測定した。反応前の分子量は 132 万であったが、反応後のキトサンの分子量は

70,000 まで低下した。

反応液は 90℃ で 30 分の加熱処理を行い、一旦、ろ過した後、5% の NaOH を用いて pH を 8 に調整し沈殿物を得た。これをろ過、水洗、乾燥させて低分子量キトサン 9.5g を得た。

#### 〔実施例 2〕

キトサン 10g を 500ml の水に分散し、濃塩酸 4.2g を加え、攪拌溶解した後、市販のプロチン P C10 (大和化成株式会社製造) 0.5g を 10ml の水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を 50℃ に保持し、12 時間攪拌を続けた。

反応液について実施例 1 と同一の GPC 法による分子量の測定の結果は 46,000 であった。

この後、実施例 1 と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

#### 〔実施例 3〕

キトサン 10g を 500ml の水に分散し、濃塩酸 4.2g を加え、攪拌溶解した後、プロテアーゼ A「アマノ」(天野製菓株式会社製造) 0.5g を 10ml の水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度

を45℃に保持し、12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果30,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例4)

キトサン10gを500mlの水に分散し、試薬特級の酢酸3.2gを加え、攪拌溶解した後にプロテアーゼA「アマノ」、0.5gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を45℃に保持し12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は25,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例5)

キトサン10gを500mlの水に分散し濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、プロテアーゼA「アマノ」0.5gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を45℃に保持し、48時間攪拌を続け

た。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は1,500であった。

反応液は90℃で30分の加熱処理を行い、5%のNaOHを用いてpHを8に調整し、生じた沈殿を除去した後、無水エタノール1500mlを加え沈殿物を得た。これをろ過、乾燥して低分子量キトサン6gを得た。

得られた低分子量キトサンは中性の水に溶解した。

(実施例6)

実施例5と同一の方法で低分子量キトサン溶液を得た。この溶液を90℃で30分の加熱処理を行い、5%のNaOHを用いてpHを8に調整し、生じた沈殿を除去した後、電気透析で脱塩を行った。その溶液中のキトサン濃度を2倍になるように濃縮した後、スプレードライヤーにて乾燥し微粉末の低分子量キトサン5gを得た。

得られた低分子量キトサンは中性の水に溶解した。

(実施例7)

キトサン10gを500mlの水に分散し濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、市販のリパーゼP「アマノ」(天野製菓株式会社製造)0.5gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の濃度を50℃に保持し、12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は62,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例8)

キトサン10gを500mlの水に分散し濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、市販のリパーゼA「アマノ」(天野製菓株式会社製造)0.5gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を45℃に保持し、12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は64,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例9)

キトサン10gを500mlの水に溶解し、濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、プロテアーゼA「アマノ」0.25gとリパーゼA「アマノ」、0.25gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を45℃に保持し、12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は38,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例10)

キトサン10gを500mlの水に分散し、濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、プロチンPC10、0.25gとリパーゼP「アマノ」、0.25gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。反応液の温度を45℃に保持し12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は46,000であった。

この後、実施例1と同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(実施例11)

キトサン10gを500mlの水に分散し、濃塩酸4.2gを加え、攪拌溶解した後、リパーゼP「アマノ」、0.1g、プロテアーゼA「アマノ」、0.2g、プロチンPC10、0.2gを10mlの水に溶解し、反応液に添加した。

反応液の温度を50℃に保持し、12時間攪拌を続けた。

反応液について実施例1と同一のGPC法による分子量の測定の結果は35,000であった。

この後、実施例1同様に処理して低分子量キトサンを得た。

(効果)

実施例の結果からも明らかなように、本発明の低分子量キトサンの製造法は、キトサンを溶解し中性プロテアーゼ及びリパーゼの1種以上で処理することにより、効率良くまた安全な、低分子量キトサンが得られる。

特許出願人 日本化薬株式会社

BEST AVAILABLE COPY

